

(PARTIAL TRANSLATION)

- (12) Gazette of Publication of Patent Application (A)
- (19) Japan Patent Office (JP)
- (11) Publication No.: 2005-110597
- (43) Publication Date: April 28, 2005
- (21) Application No.: 2003-350265
- (22) Filing Date: October 9, 2003
- (71) Applicant: Mitsukan Group Corporation  
2-6, Nakamura-cho, Handa-shi, Aichi

(54) Title of the invention: A novel plasmid derived from acetic acid bacteria and the utilization thereof

(57) **ABSTRACT** (corrected)

**SUBJECT:**

To develop a plasmid vector which can introduce a gene efficiently into the cells of acetic acid bacteria, especially bacteria belonging to genera Acetobacter and Gluconacetobacter having alcohol oxidation ability, and which is stable in the cells thereof.

**MEANS TO SOLVE:**

Plasmid pGI1 capable of replicating autonomously in acetic acid bacteria, which comprises a specific nucleotide sequence comprising substitution, deletion, insertion, addition or inversion of one or several bases in said specific nucleotide sequence;

A vector for acetic acid bacteria which comprises at least

a part of said plasmid and a marker gene for selection, and which can replicate autonomously in the cells of acetic acid bacteria.

FIGURE TO BE ELECTED:

None.

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-110597  
(P2005-110597A)

(43) 公開日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

C12N 15/09

F1

C12N 15/00 ZNAA

テーマコード (参考)

4B024

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2003-350265 (P2003-350265)

(22) 出願日 平成15年10月9日(2003.10.9)

(71) 出願人 398065531

株式会社ミツカングループ本社  
愛知県半田市中村町2丁目6番地

(74) 代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎

(74) 代理人 100086221

弁理士 矢野 裕也

(72) 発明者 飯田 彩

愛知県半田市瑞穂町10-7-3 コーポ  
YOU A307号

Fターム(参考) 4B024 AA05 DA05 FA10 GA14

(54) 【発明の名称】 酢酸菌由来の新規プラスミドとその利用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 酢酸菌、特にアルコール酸化能を有するアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属の酢酸菌への遺伝子導入効率が高く、且つ細胞内での安定性に優れるプラスミドベクターの開発を目的とする。

【解決手段】 特定の塩基配列、又は前記配列において1若しくは数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、かつ、酢酸菌で自律複製可能なプラスミドpGI1；前記プラスミドの少なくとも一部と選択マーカー遺伝子を含有し、酢酸菌の細胞内で複製可能であることを特徴とする酢酸菌用ベクター。

【選択図】 なし

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-110597

(P2005-110597A)

(43) 公開日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
C12N 15/09F1  
C12N 15/00 ZNAAテーマコード(参考)  
4B024

審査請求 未請求 請求項の数 2 OL (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2003-350265 (P2003-350265)  
(22) 出願日 平成15年10月9日(2003.10.9)(71) 出願人 398065531  
株式会社ミツカングループ本社  
愛知県半田市中村町2丁目6番地  
(74) 代理人 100074077  
弁理士 久保田 藤郎  
(74) 代理人 100086221  
弁理士 矢野 裕也  
(72) 発明者 飯田 彩  
愛知県半田市瑞穂町10-7-3 コーポ  
YOU A307号  
Fターム(参考) 4B024 AA05 DA05 FA10 GA14

(54) 【発明の名称】 酢酸菌由来の新規プラスミドとその利用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 酢酸菌、特にアルコール酸化能を有するアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属の酢酸菌への遺伝子導入効率が高く、且つ細胞内での安定性に優れるプラスミドベクターの開発を目的とする。

【解決手段】 特定の塩基配列、又は前記配列において1若しくは数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、かつ、酢酸菌で自律複製可能なプラスミドpGI1；前記プラスミドの少なくとも一部と選択マーカー遺伝子を含有し、酢酸菌の細胞内で複製可能であることを特徴とする酢酸菌用ベクター。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記の (A)、又は (B) に示すプラスミド p G I 1。

(A) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列からなるプラスミド。

(B) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列において、1 若しくは数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、かつ、酢酸菌で自律複製可能なプラスミド。

## 【請求項 2】

請求項 1 記載のプラスミドの少なくとも一部と選択マーカー遺伝子を含有し、酢酸菌の細胞内で複製可能であることを特徴とする酢酸菌用ベクター。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、遺伝子操作技術に関し、より詳細には、酢酸菌、特にアセトバクター属 (*Acetobacter*) 及びグルコンアセトバクター属 (*Gluconacetobacter*) の遺伝子操作に有用なプラスミド及びその利用に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

酢酸菌は、食酢製造に広く利用されているアルコール酸化能を有する微生物である。特に、アルコール酸化能を有するアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属の酢酸菌は、工業的な酢酸発酵に利用されている。

20

このうち、グルコンアセトバクター属の酢酸菌であるグルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*)、特にアセトバクター・アルトアセチゲネス MH-24 株 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) (特許生物寄託センターに F E R M B P-491 として寄託) は、20% 以上の酢酸を培地中に蓄積することが可能な、最も酢酸耐性が高く有用な酢酸菌である。

## 【0003】

一方、酢酸発酵においては、より高い酢酸濃度においても増殖能力や発酵能力が低下しない、すなわち酢酸耐性の高い酢酸菌を開発することなどが求められている。その一手段として、酢酸耐性に関与する遺伝子 (酢酸耐性遺伝子) をクローニングし、その酢酸耐性遺伝子を用いて酢酸菌を育種、改良することなどが試みられている。

30

ここで、酢酸菌における遺伝子操作を実施する上では、酢酸菌で自律複製可能なベクターなどが必要である。一般の遺伝子操作で用いられる公知のマルチコピープラスミドベクターとしては、p U F 1 0 6 (例えば、非特許文献 1 参照)、p M V 2 4 (例えば、非特許文献 2 参照) や p T A 5 0 0 1 (A) 及び p T A 5 0 0 1 (B) (例えば、特許文献 1 参照) などが挙げられる。

## 【0004】

しかしながら、これらのマルチコピーベクターは、上述したアセトバクター・アルトアセチゲネス MH-24 株を初めとするグルコンアセトバクター・エンタニイ等の実用酢酸菌とは異なる酢酸菌に由来するプラスミドを用いて作製されているため、前記実用酢酸菌への遺伝子導入効率が低い。また、形質転換できたとしても、細胞内においてプラスミドベクターを安定的に保持することが難しい等の問題点があったため、酢酸菌での遺伝子操作に関し、より実用性の高いベクターの開発が望まれていた。

40

## 【0005】

【非特許文献 1】「セルロース (Cellulose)、p. 153-158、1989 年」

【非特許文献 2】「アプライド・アンド・エンバイロメタル・マイクロバイオロジー (Applied and Environmental Microbiology) 55 巻、p. 171-176、1989 年」

【特許文献 1】特開昭 60-9488 号公報

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

50

## 【0006】

本発明は、このような状況下において、酢酸菌、特にアルコール酸化能を有するアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属の酢酸菌への遺伝子導入効率が高く、かつ、細胞内での安定性に優れるプラスミドベクターの開発を目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

前記課題に基づき、本発明者は鋭意検討した結果、有用酢酸菌の1つであるグルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*)、特にアセトバクター・アルトアセチゲネス MH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株の細胞内でも複製しうる環状二本鎖DNAプラスミド(以下、プラスミドpGI.1という。)を見出した。

さらに、このプラスミドpGI.1に、選択マーカー遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子を持つ大腸菌プラスミドベクターpUC18を連結してキメラプラスミドを作製し、酢酸菌に形質転換を試みたところ、アセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24株以外にも、アセトバクター・アセチ No. 1023株 (*Acetobacter aceti* No.1023) (特許生物寄託センターにFERM BP-2287として寄託) やアセトバクター・アセチ IF03283株 (*Acetobacter aceti* IF03283)、及びグルコンアセトバクター・ザイリナス IF03288株 (*Gluconacetobacter xylinus* IF03288) など、多くの酢酸菌において前記選択マーカー遺伝子が発現し、形質転換株を得ることに成功し、本発明を完成させるに至った。

## 【0008】

すなわち請求項1記載の本発明は、下記の(A)、又は(B)に示すプラスミドpGI.1である。

(A) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列からなるプラスミド。

(B) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列において、1若しくは数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、かつ、酢酸菌で自律複製可能なプラスミド。

請求項2記載の本発明は、請求項1記載のプラスミドの少なくとも一部と選択マーカー遺伝子を含むし、酢酸菌の細胞内で複製可能であることを特徴とする酢酸菌用ベクターである。

## 【発明の効果】

## 【0009】

本発明により、酢酸菌への遺伝子導入効率が高く、かつ、細胞内での安定性に優れるプラスミド、及び酢酸菌用ベクターが提供されるので、酢酸菌における遺伝子操作の実施に好適に利用することができる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0010】

以下、本発明を詳細に説明する。

請求項1に係る本発明のプラスミドpGI.1は、下記の(A)、又は(B)に示すものである。

(A) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列からなるプラスミド。

(B) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列において、1若しくは数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、かつ、酢酸菌で自律複製可能なプラスミド。

## 【0011】

まず、(A) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列からなるプラスミドは、約3.1 kbpの長さを持ち、図1の制限酵素地図を有する環状二本鎖プラスミドである。図1中、「Sfi I」及び「Hinc II」は、制限酵素認識部位を示す。また、括弧内の数字は、bp単位で示した塩基番号を示す。更に、中央の「pGI.1」は、プラスミド名を、「3080bp」は、プラスミドの総塩基数を示す。

即ち、図1に示すように(A) プラスミドは、配列表の配列番号1に記載の約3100

塩基対 (bp) からなり、Hinc I Iで3カ所、また、Sfi Iで1カ所の認識部位を有する環状二本鎖DNAプラスミドとして得ることができる。また、プラスミド (A) は、EcoR I、Sac I、Kpn I、Sma I、BamH I、Xba I、Sal I、Pst I、Sph I、Hind IIIの認識部位を有していない。

#### 【0012】

このような (A) プラスミドは、グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*)、例えばアセトバクター・アルトアセチゲネス MH-24 株 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) (特許生物寄託センターにFERM BP-491として寄託) から一般的な遺伝子工学的手法により調製することができる。

例えば、アセトバクター・アルトアセチゲネス MH-24 株を適当な培地 (例えば、YPG培地) で培養し、次いで、これを集菌し、溶菌する。溶菌には、大腸菌等の細菌を溶菌させる公知の方法を適用することができ、例えば水酸化ナトリウムやドデシル硫酸ナトリウムを用いて行うことができる。得られる溶菌物から、例えばフェノール抽出およびエチジウムブロミド存在下の塩化セシウム密度勾配遠心法の如き通常用いられる方法により、目的のプラスミドを分離、精製することができる。

#### 【0013】

(A) プラスミドの自律複製機能や宿主細胞内での安定維持に関与する遺伝子など、プラスミドとして宿主細胞内で複製したり、或いは存在するために必須の遺伝子は、一般的なプラスミドと同様に、(A) プラスミドを構成する配列表の配列番号1に記載の塩基配列の一部に担われていると考えられ、この領域の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位が起こると、プラスミドとして機能しなくなる場合がある。しかし、配列表の配列番号1に記載の塩基配列の中で、プラスミドの自律複製機能や宿主細胞内での保持に関与しない領域については、欠失していたり、別の領域が挿入又は付加されていたり、或いは位置が逆になっていたりするような誘導体も同様にプラスミドとしての機能を有すると考えられる。それ故、請求項1に係る本発明のプラスミドpGI1は、(A) プラスミドのみに限定されるのではなく、(B) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列において、1若しくは数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、かつ、酢酸菌で自律複製可能なプラスミドであっても良い。

#### 【0014】

したがって、(B) プラスミドにおける配列表の配列番号1に記載の塩基配列において、1若しくは数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列とは、上述したように、配列表の配列番号1に記載の塩基配列中、プラスミドの自律複製機能や宿主細胞内での保持に関与しない領域において、1若しくは数個の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列を意味する。

#### 【0015】

また、(B) プラスミドにおいて、酢酸菌で自律複製可能とは、酢酸菌細胞内で自律的に複製でき、細胞内に安定して存在することができることを意味する。

酢酸菌としては、アルコール酸化能を有するものであれば良く、中でも、アセトバクター属又はグルコンアセトバクター属の酢酸菌が好ましい。

アセトバクター属の酢酸菌として、例えばアセトバクター・アセチ (*Acetobacter acetii*) が挙げられ、具体的には、アセトバクター・アセチ No. 1023 株 (*Acetobacter acetii* No.1023) (特許生物寄託センターにFERM BP-2287として寄託) やアセトバクター・アセチ IF03283 株 (*Acetobacter acetii* IF03283) が挙げられる。

また、グルコンアセトバクター属の酢酸菌としては、グルコンアセトバクター・ユウロパエウス DSM6160 株 (*Gluconacetobacter europaeus* DSM6160) やグルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*)、例えばアセトバクター・アルトアセチゲネス MH-24 株 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) (特許生物寄託センターにFERM BP-491として寄託) や、グルコンアセトバクター・ザイリナス IF03288 株 (*Gluconacetobacter xylinus* IF03288) が挙げられる。

## 【0016】

このようなプラスミド (B) は、プラスミド (A) と同様に、グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*)、例えばアセトバクター・アルトアセチゲネス MH-24 株 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) (特許生物寄託センターに FERM BP-491 として寄託) から一般的な遺伝子工学的手法により、具体的には、実施例 1 に示すような手順及び条件により、調製することができる。

## 【0017】

このような請求項 1 に係る本発明のプラスミド pGI1 は、選択マーカー遺伝子を連結することにより、宿主としての酢酸菌、特にアルコール酸化能を有するアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属の酢酸菌を形質転換するためのベクターとして用いることができる。このような酢酸菌用ベクターを提供するのが、請求項 2 に係る本発明である。

10

即ち、請求項 2 に係る本発明の酢酸菌用ベクターは、請求項 1 記載のプラスミドの少なくとも一部と選択マーカー遺伝子を含有し、酢酸菌の細胞内で複製可能であることを特徴とする。

## 【0018】

選択マーカー遺伝子とは、導入すべき形質を担う遺伝子が酢酸菌に導入されたか否かを知るためのマーカーとなり得る遺伝子を意味し、アンピシリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子などの薬剤耐性遺伝子などを挙げることができる。具体的には例えば、大腸菌のプラスミド pBR322 のアンピシリン耐性遺伝子、プラスミド pACYC177 のカナマイシン耐性遺伝子、プラスミド pACYC184 のクロラムフェニコール耐性遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子などが挙げられる。

20

## 【0019】

請求項 2 に係る本発明の酢酸菌用ベクターは、請求項 1 記載のプラスミドの少なくとも一部と選択マーカー遺伝子を含有するが、その他に、導入すべき形質を担う遺伝子や発現調節に関与する DNA 配列を含有するものであっても良い。

導入すべき形質を担う遺伝子としては、特に限定はなく、プロテアーゼ、リパーゼ、DNA 合成酵素、RNA 合成酵素、アミノ酸や有機酸合成系に関与する酵素代謝合成酵素などの酵素の遺伝子などを挙げることができ、具体的には例えば、酢酸菌のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (例えば、「ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (Journal of Bacteriology)、175 巻、p. 6857-6866、1993 年」参照) を挙げることができる。

30

## 【0020】

発現調節に関与する DNA 配列としては、酢酸菌、特にアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌中で効率よく機能するものであれば特に制限はなく、プロモーター、エンハンサー、各種リプレッサー遺伝子およびそれに対応するリプレッサー結合領域などを挙げることができる。

## 【0021】

請求項 2 に係る本発明の酢酸菌用ベクターは、上記のような選択マーカー遺伝子を含有するプラスミドが、請求項 1 に係る本発明のプラスミド pGI1 の少なくとも一部に連結されたものであっても良い。

40

連結するプラスミドとしては、導入すべき形質を担う所望の遺伝子を導入してあらかじめ作製しておいたプラスミドの他、アンピシリン耐性遺伝子を担う pUC18、テトラサイクリン耐性遺伝子を担う pBR322、カナマイシン耐性遺伝子を担う pHSG298 等の公知のプラスミドを挙げることができる。尚、pUC18 プラスミドは、大腸菌で自律複製可能なため、これを連結することにより、酢酸菌-大腸菌シャトルベクターを得ることができる。

## 【0022】

このような請求項 2 に係る本発明の酢酸菌用ベクターは、請求項 1 に係る本発明のプラ

50



スミドの少なくとも一部に、選択マーカー遺伝子、例えば選択マーカー遺伝子を含有するプラスミド（例えば、pUC18）を連結することによって作製することができる。

具体的には、例えば、請求項1に係る本発明のプラスミドpGI1を、制限酵素で切断し、PCR法によって増幅した後、更に制限酵素で切断し、一方、プラスミド（例えば、pUC18）を、同じ制限酵素で切断し、両者をT4DNAリガーゼで連結反応（ライゲーション（Ligation））させることにより、得ることができる。

制限酵素としては、幅広い種類の酵素が使用でき、使用する酵素に応じて切断反応時間などを調節し、切断の程度を調節する。例えば、Sfi Iの場合は、酵素濃度1ユニット/μg、温度50℃で1時間、Aat Iの場合は酵素濃度1ユニット/μg、温度37℃で1時間作用させる。なお、後記実施例では、Sfi I及びAat Iを用いた。

10

#### 【0023】

図2に、請求項2に係る本発明の酢酸菌用ベクターの一例（pUC18を導入して得られる酢酸菌用ベクターpGI18）の作製手順及び制限酵素地図を示す。図2中、「Aat

I」及び「Sfi I」は、制限酵素認識部位を示す。また、MCSは、マルチクローニングサイトを、Amp<sup>r</sup>は、アンピシリン耐性遺伝子部位を、括弧内の数字は、bp単位で示した塩基番号を示す。更に、中央の「pUC18」「pGI1」及び「pGI18」は、プラスミド名を、「2.7kbp」、「3.1kbp」及び「5.8kbp」は、プラスミドの総塩基数を示す。図2に示す酢酸菌用ベクターpGI18は、pUC18及びpGI1のいずれも含有しており、全体の長さは約5800塩基対（5.8kbp）である。

20

#### 【0024】

このような請求項2に係る本発明の酢酸菌用ベクターは、酢酸菌、特にアルコール酸化能を有するアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属の酢酸菌の細胞内で複製可能である。言い換えれば、請求項2に係る本発明の酢酸菌用ベクターは、酢酸菌に形質転換させて所望の遺伝子が導入されてなる組換え酢酸菌を得ることが可能である。酢酸菌の具体例については、請求項1に係る本発明の説明において示した通りである。

尚、前述したように、選択マーカー遺伝子を含むプラスミド（例えば、pUC18）を連結することにより、酢酸菌の細胞内のみならず、大腸菌の細胞内でも複製可能な酢酸菌-大腸菌シャトルベクターを得ることができる。

30

#### 【0025】

形質転換については、特に限定はなく、通常行われる手順・条件を適用することができる。例えば、塩化カルシウム法（例えば、「アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー（Agricultural and Biological Chemistry），49巻，p.2091-2097，1985年」参照）、エレクトロポレーション法（例えば、「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー（Bioscience, Biotechnology and Biochemistry），58巻，p.974-975，1994年」参照）などを挙げることができる。

請求項2に係る本発明の酢酸菌用ベクターが導入された酢酸菌は、ベクターの選択マーカー遺伝子の担う表現形質に対応する選択培地、例えば選択マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子であれば、その薬剤を含む培地で培養することにより、選択することが可能である。

40

#### 【実施例】

#### 【0026】

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

#### 実施例1（プラスミドpGI1の調製）

グルコンアセトバクター・エンタニイ（*Gluconacetobacter entanii*）の1株であるアセトバクター・アルトアセトゲネス MH-24株（*Acetobacter altoacetigenes* MH-24）（FERM BP-491）を、6%酢酸と4%エタノールを添加したYPG培地（3%グルコース、0.5%酵母エキス、0.2%ポリペプトン含有）中で、30℃にて24

50

0 時間から 3 3 6 時間振盪培養した。得られた菌体について水酸化ナトリウムやドデシル硫酸ナトリウムを用いて溶菌後、フェノール処理し、更にエタノールによりプラスミド DNA を精製した。

得られたプラスミド DNA を、各種制限酵素（宝酒造社製）で切断し（37℃、酵素濃度 1 ユニット／ml）、得られた DNA 断片の塩基対長をアガロースゲル電気泳動により求めた。図 1 に p G I 1 の制限酵素地図を示す。図 1 中、括弧内の数字は、bp 単位で示した塩基番号を示す。

#### 【0027】

図 1 から明らかなように、得られたプラスミド DNA は H i n c I I で 3 カ所、また、S f i I で 1 カ所の認識部位を有する環状二本鎖 DNA プラスミドであり、プラスミド全体の長さは約 3 1 0 0 塩基対（bp）であった。また、E c o R I、S a c I、K p n I、S m a I、B a m H I、X b a I、S a l I、P s t I、S p h I、H i n d I I I の認識部位を有していなかった。

10

得られたプラスミド DNA をプラスミド p G I 1 と命名し、以下の実施例に用いた。

#### 【0028】

実施例 2（p G I 1 の全塩基配列の決定）

p U C 1 8（宝酒造社製：2 6 8 6 bp）を S m a I で切断し、p G I 1 を S f i I で切断後、T 4 DNA ポリメラーゼで平滑化したものを、実施例 1 で得られたプラスミド p G I 1 に連結反応させた。p G I 1 の塩基配列を、サンガーのダイデオキシ・チェーレン・ターミネーション法によって決定した。尚、塩基配列の決定は、DNA 2 本鎖の両方の全領域について行ない、切断点は全てオーバーラップする様に行なった。

20

その結果、配列表の配列番号 1 記載の塩基配列が決定された。

#### 【0029】

実施例 3（p G I 1 へのアンピシリン（Amp）耐性遺伝子の付与並びに酢酸菌用ベクターの作成）

図 2 に示す手順で酢酸菌用ベクターの作製を試みた。

上記実施例 1 で得られたプラスミド p G I 1 を、K O D - P l u s -（東洋紡績社製）を用いて PCR 法によって増幅し、A a t I I で切断した。

PCR 法は図 3 に示すようにして実施した。すなわち、実施例 1 で調製したプラスミド p G I 1 を鋳型として、プライマーとして A a t I I 認識部位を有するプライマー 1 及びプライマー 2 を用い、下記する条件にて、PCR 法を実施した。プライマー 1 及びプライマー 2 の塩基配列は、それぞれ配列表の配列番号 2 及び配列番号 3 に示す通りである。

30

PCR の条件は、94℃30秒、60℃30秒、68℃3分を 1 サイクルとして、30 サイクルとした。

#### 【0030】

一方、アンピシリン（Amp）耐性遺伝子を担う p U C 1 8（宝酒造社製：2 6 8 6 bp）を A a t I I で切断し（37℃、酵素濃度 1 ユニット／ml）、T 4 DNA リガーゼで、実施例 1 で得られたプラスミド p G I 1 に連結反応（L i g a t i o n）させた。連結後の反応液を、常法に従い、大腸菌 J M 1 0 9 株（宝酒造社製）に形質転換し、100 μg/ml のアンピシリンナトリウムを含む LB 培地（トリプトン 10g、イーストエキス 5g、NaCl 5g／1 リットル）プレート上で選択して Amp 耐性の形質転換株を得た。

40

得られた形質転換株よりプラスミドを調製し、その制限酵素切断パターンを解析した。図 2 に、得られたプラスミドの制限酵素地図を示す。図 2 中、「A a t I I」及び「S f i I」は、制限酵素認識部位を示す。また、M C S は、マルチクローニングサイトを、A m p<sup>r</sup> は、アンピシリン耐性遺伝子部位を、括弧内の数字は、bp 単位で示した塩基番号を示す。更に、中央の「p U C 1 8」「p G I 1」及び「p G I 1 8」は、プラスミド名を、「2.7 k b p」、「3.1 k b p」及び「5.8 k b p」は、プラスミドの総塩基数を示す。

#### 【0031】

50

図2から明らかなように、得られたプラスミドはpUC18およびpGI1のいずれも含有しており、全体の長さは約5800塩基対(5.8kbp)であった。このプラスミドを酢酸菌用ベクターpGI18と命名した。

#### 【0032】

実施例4(酢酸菌アセトバクター・アセチNo.1023株への形質転換)

実施例3で調製した酢酸菌用ベクターpGI18を、アセトバクター・アセチNo.1023株(*Acetobacter aceti* No.1023)(FERM BP-2287)にエレクトロポレーション法(例えば、「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー(Bioscience, Biotechnology and Biochemistry), 58巻, p.974-975, 1994年」参照)によって形質転換した。形質転換株は、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを添加したYPG寒天培地で選択した。

選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株について、定法によりプラスミドを抽出して解析したところ、ベクターpGI18を保持していることを確認した。

#### 【0033】

実施例5(アセトバクター・アセチIFO3283株への形質転換)

実施例3で調製した酢酸菌用ベクターpGI18を、アセトバクター・アセチIFO3283株(*Acetobacter aceti* IFO3283)にエレクトロポレーション法(例えば、「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー(Bioscience, Biotechnology and Biochemistry), 58巻, p.974-975, 1994年」参照)によって形質転換した。形質転換株は、100 $\mu$ g/mlのアンピシリン及び2%の酢酸を添加したYPG寒天培地で選択した。

選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株について、定法によりプラスミドを抽出して解析し、ベクターpGI18を保持していることを確認した。

#### 【0034】

実施例6(グルコンアセトバクター・ザイリナスIFO3288株への形質転換)

実施例3で調製したpGI18を、グルコンアセトバクター・ザイリナスIFO3288株(*Gluconacetobacter xylinus* IFO3288)にエレクトロポレーション法(例えば、「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー(Bioscience, Biotechnology and Biochemistry), 58巻, p.974-975, 1994年」参照)によって形質転換した。形質転換株は、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを添加したYPG寒天培地で選択した。

選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株について、定法によりプラスミドを抽出して解析し、ベクターpGI18を保持していることを確認した。

#### 【0035】

実施例7(グルコンアセトバクター・エンタニイへの形質転換)

実施例3で調製したpGI18を、グルコンアセトバクター・エンタニイ(*Gluconacetobacter entanii*)、特にアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24株(*Acetobacter altoacetigenes* MH-24)(特許生物寄託センターにFERM BP-491として寄託)にエレクトロポレーション法(例えば、「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー(Bioscience, Biotechnology and Biochemistry), 58巻, p.974-975, 1994年」参照)によって形質転換した。形質転換株は、100 $\mu$ g/mlのアンピシリン及び3%の酢酸と4%のエタノールを添加したYPG寒天培地(寒天濃度0.55%の軟寒天培地)で選択した。

選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株について、定法によりプラスミドを抽出して解析し、ベクターpGI18を保持していることを確認した。

以上のことから請求項1に係る本発明のプラスミドpGI1は、酢酸菌、特にアルコール酸化能を有するアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属の酢酸菌において普遍的に使用可能なベクターとして有用であることは明らかである。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0036】

本発明により、酢酸菌への遺伝子導入効率が高く、且つ細胞内での安定性に優れるプラスミド、及び酢酸菌用ベクターが提供されるので、酢酸菌における遺伝子操作の実施に好適に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】 グルコンアセトバクター・エンタニイ（アセトバクター・アルトアセチゲネス）由来のプラスミド pGI1 の制限酵素地図を示した図である。

【図2】 pGI18 の構築図及び制限酵素地図を示した図である。

【図3】 実施例3におけるPCR法のプライマーの位置を示した図である。

【符号の説明】

10

【0038】

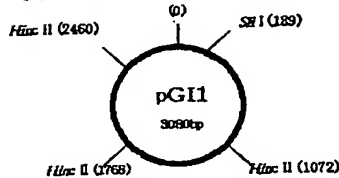
図1中、「Sfi I」及び「Hinc II」は、制限酵素認識部位を示す。また、括弧内の数字は、bp単位で示した塩基番号を示す。更に、中央の「pGI1」は、プラスミド名を、「3080bp」は、プラスミドの総塩基数を示す。

図2中、「Aat II」及び「Sfi I」は、制限酵素認識部位を示す。また、MCSは、マルチクローニングサイトを、Amp<sup>r</sup>は、アンピシリン耐性遺伝子部位を、括弧内の数字は、bp単位で示した塩基番号を示す。更に、中央の「pUC18」「pGI1」及び「pGI18」は、プラスミド名を、「2.7kbp」、「3.1kbp」及び「5.8kbp」は、プラスミドの総塩基数を示す。

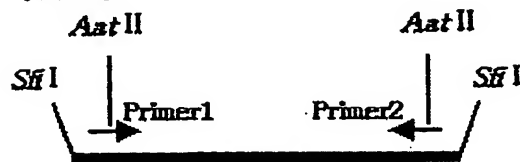
図3中、Primer1及びPrimer2は、それぞれプライマー1及びプライマー2を示し、「Sfi I」及び「Aat II」は、制限酵素認識部位を示す。

20

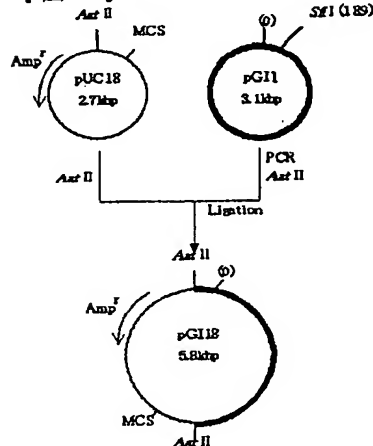
【図1】



【図3】



【図2】



【配列表】

2005110597000001.app